植 物 分 类 与 资 源 学 报 2012, **34** (1): 47~55
Plant Diversity and Resources DOI: 10.3724/SP.J.1143.2012.11143

热胁迫下中甸角蒿叶片 SSH 文库的构建及初步分析*

丁 勇[1,2], 常 玮[1**], 张石宝[1], 胡 虹[1***]
(1 中国科学院昆明植物研究所资源植物与生物技术实验室, 云南 昆明 650201;
2 西南林业大学生命科学学院, 云南 昆明 650224)

摘要: 高温可能是限制中甸角蒿 (*Incarvillea zhongdiannensis*) 向低海拔地区引种驯化的主要因素之一。为了从基因表达水平研究中甸角蒿高温胁迫响应的分子机制, 本研究利用 SSH 技术构建了中甸角蒿对高温 (30℃) 处理响应的正反向抑制性差减杂交文库。文库质量检测表明抑制性差减杂交效率较高, 质量较好。通过对正反向文库中部分 EST 进行序列测定, 获得了 60 条高质量的表达序列标签, 平均长度为 537 bp。对序列进行 BLAST 比对及功能注释, 50 条 EST 为功能已知的基因, 分别参与信号转导与转录、植物抗逆性反应、光合作用、代谢与能量、蛋白质合成与转运、蛋白质命运、细胞结构和细胞生长等过程。6 个 EST 与功能未知基因的同源性较高。获得的 4 个未匹配的 EST 推测为新基因, 可能在植物热耐受性方面具有重要的作用。

关键词: 中甸角蒿; 高温胁迫; 抑制差减杂交; 表达序列标签
中图分类号: Q 78, Q 945 **文献标识码**: A **文章编号**: 2095-0845(2012)01-047-09

Construction of Leave Library by SSH and Preliminary Analysis of Genes Responsible for Heat Sress in *Incarvillea zhongdiannensis*

DING Yong[1,2], CHANG Wei[1**], ZHANG Shi-Bao[1], HU Hong[1***]
(1 *Key Laboratory of Economic Plants and Biotechnology*, *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650201, China; 2 *School of Life Sciences*, *Southwest Forestry University*, Kunming 650224, China)

Abstract: High temperature might be one of the main limiting factors to be introduced and domesticated into lower altitude for *Incarvillea zhongdiannensis*. To further reveal the underlying molecular mechanism in *I. zhongdiannensis* responding to high temperature, the suppression subtractive hybridization approach (SSH) was used in this study. The results showed the quality of forward or reverse subtraction cDNA library is good enough for further SSH experiments. Total sixty expressed tags (ESTs) with high quality were randomly obtained by SSH and sequencing. According to BLAST screening and functional annotation, 50 ESTs with known function were classified into 9 broad categories such as defense/stress, photosynthesis, metabolism, energy, signal transduction and transcription, protein fate, transporter, biosynthesis, cell structure and cell growth. There were six ESTs significantly matched with hypothetical proteins. Four ESTs with no hits possibly encode novel genes and play important role in *I. zhongdiannensis* responding to high temperature stress.

Key words: *Incarvillea zhongdiannensis*; High temperature stress; Suppression subtractive hybridization (SSH); Expressed sequence tag (EST)

---

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30870239); 中科院昆明植物研究所资源植物与生物技术实验室青年科研项目
** 与第一作者同等贡献
*** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: Huhong@mail.kib.ac.cn
收稿日期: 2011-10-17, 2011-12-01 接受发表
作者简介: 丁 勇 (1979-) 男, 讲师, 主要从事植物分子生物学方面的研究。

云南具有园艺学界公认的丰富的野生花卉种质资源。高山花卉作为野生花卉中的奇葩，具有花色艳丽，花朵奇特等特色，是云南野生花卉中最具特色和开发潜力的种质资源，它们主要分布于滇西北海拔2 500 m以上的高山地区（冯国楣，1981）。其中紫葳科（Bignoniaceae）角蒿（*Incarvillea*）植物就是一类极具观赏价值的高山花卉，花大而颜色艳丽，它们主要分布于西亚和东亚，中国产11种3变种，滇西北产8种（王文采等，1990）。中甸角蒿（*Incarvillea zhongdiannensis* Rrey-willson）为我国特有种，生长在滇西北（中甸）海拔3 100～3 500 m的云杉林边或高山流石滩，不仅具较高的园艺价值，其块根还具多种药用价值（杜有新等，2003）。研究表明中甸角蒿能在15～26℃下良好生长（张石宝等，2005），但向低海拔地区引种栽培存在一定的困难。根据已经开展的研究（蔡艳飞等，2008；雷鸣等，2009；席雪等，2010），推测高温可能是限制中甸角蒿向低海拔地区引种栽培的主要因素，但仍缺乏相应的分子机制研究。抑制差减杂交（suppression subtractive hybridization，SSH）技术（Diatachenko等，1996）通过两次差减杂交和两次抑制性PCR，使差异基因得到富集和均匀化，与RDA和DDRT-PCR等方法相比具有灵敏性高、操作简单、假阳性率低、速度快和效率高等特点。利用SSH技术，黄锦文等（2009）构建了沟叶结缕草（*Zoysia matrella*）对高温处理响应的正向差减文库，对热诱导产生的差异表达基因进行了分析。Zhang等（2005）探讨了热耐受型羊茅草（fescue）和热敏感型羊茅草之间差异表达基因，结果表明与光合作用、蛋白质合成、信号转导和转录因子等相关基因在热耐受型羊茅草中上调表达，与代谢和胁迫相关基因在热敏感型羊茅草中上调表达。本研究利用SSH技术构建了高温胁迫下中甸角蒿正反向SSH文库，并对文库进行初步分析，旨在了解高温对中甸角蒿基因表达模式的影响，以及这些基因表达与引种驯化过程中生理变化的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料及其处理

从云南香格里拉收获野生中甸角蒿种子，2010年9月23日播种于6个50孔育苗盘内，播种基质配比为腐叶土：河沙：红土：珍珠岩（2∶3∶2∶3，V∶V∶V∶V）。其中随机3盘置于人工气候箱（RXZ/PQX-380D）中，适温（20±1）℃，相对湿度60%，光照强度约为600 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$，每天光照培养12 h，暗培养12 h；另3盘置于另一同型号人工气候箱中，高温（30±1）℃，其他条件同上。一周后两个温度处理的中甸角蒿种子均萌发，每孔保留2～3颗幼苗。2010年11月19日，分别随机选取两个温度处理的中甸角蒿叶片，于液氮速冻，置于-80℃冰箱备用。

1.2 中甸角蒿叶片总RNA提取与mRNA的分离与纯化

采用TRIzol（Invitrogen）法提取中甸角蒿叶片总RNA。总RNA溶于DEPC-H_2O，用DnaseⅠ（Invitrogen）37℃处理30 min，去除DNA的干扰。1.2%琼脂糖凝胶甲醛变性电泳检测总RNA完整性，紫外分光光度计（LibraS22）测定其浓度及纯度。利用FastTrack® MAG mRNA Isolation Kits（invitrogen）分离mRNA，作为构建SSH cDNA文库的起始材料。

1.3 SSH cDNA文库的构建

依照PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit（Clontech）的说明书进行SSH操作。以高温处理的中甸角蒿叶片为Tester、适温处理的中甸角蒿叶片为Driver，构建正向SSH文库；以适温处理的中甸角蒿叶片为Tester、高温处理的中甸角蒿叶片为Driver，构建反向SSH文库。正反向SSH产物经过纯化后分别与pMD18-T Simple Vector（TaKaRa）连接，热激法转化大肠杆菌DH5α感受态细胞（TaKaRa），涂于含有Amp/IPTG/X-gal的LB培养基上进行筛选，挑取白色克隆37℃震荡培养过夜，加甘油至终浓度15%，-80℃保存。

1.4 文库插入片段大小检查、序列测定和BLAST分析

从上述构建的SSH文库中随机取单克隆菌液1 μL为模板，利用M13引物进行PCR扩增，检测文库插入片段大小。PCR反应体系：10×PCR Buffer 2 μL，10 $mmol \cdot L^{-1}$的dNTPs 0.5 μL，20 $\mu mol \cdot L^{-1}$的上、下游引物各0.5 μL，5 $U \cdot \mu L^{-1}$的DNA Polymerase 0.3 μL，ddH_2O补足20 μL。PCR反应程序为：94℃预变性4 min；94℃变性30 sec，56℃退火30 sec，72℃延伸3 min，30个循环；最后72℃延伸10 min。取10 μL扩增产物用含EB的1.2%琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小。挑选阳性克隆送上海英俊生物工程有限公司进行测序，所获序列去掉载体和接头序列，获得EST。采用NCBI网站的BLAST工具进行序列比对和功能注释分析。

2 结果与分析

2.1 总RNA的提取与mRNA的纯化

RNA的纯度和完整性是SSH文库构建成功的

关键性因素，本实验提取适温和高温处理的中甸角蒿叶片总 RNA 的 *A260/A280* nm 值分别为 1.92 和 1.89，*A260/A230* nm 值分别为 2.35 和 2.34。电泳结果显示总 RNA 中的 28S rRNA 与 18S rRNA 的亮度比例约为 2∶1（图 1）。表明本实验分离得到的中甸角蒿叶片总 RNA 的纯度和完整性较好，总 RNA 质量达到建库要求，可进一步用于分离 mRNA。分离的 mRNA 经电泳检测呈均匀的弥散带（图 2），主要集中在 400 ~ 4 000 bp 之间。表明 mRNA 质量较好，可以用于 SSH 文库构建。

2.2　双链 cDNA 的合成和 Rsa I 酶切

以适温和高温处理的中甸角蒿叶片 mRNA 分别为模板，利用 AMV 反转录酶合成 cDNA 第一链。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，结果显示利用双链合成酶合成的双链 cDNA 条带呈弥散状，主要分布在 500 ~ 5 000 bp 内，Rsa Ⅰ 酶切后的双链 cDNA 片段集中在 400 ~ 1 000 bp 左右（图 3）。表明双链 cDNA 的质量和 Rsa Ⅰ 酶切效果均达到要求。

2.3　SSH cDNA 文库的质量检测

经过两轮消减杂交和两次抑制 PCR，一些差异表达的基因得到了富集。杂交后的 cDNA 以通用引物 primer 1 进行第一轮 PCR 扩增，以巢式引物对进行第二轮 PCR 扩增。经检测，第二轮 PCR 产物比第一轮 PCR 产物电泳条带减弱、特异性增强、分布范围下移，片段大小主要集中在 300 ~ 1 000 bp，且主要集中在 600 bp 左右（图 4）。说明连接效率较好，抑制差减杂交效率较高。

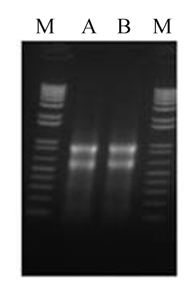


图 1　中甸角蒿叶片总 RNA 的电泳检测

M：1 kb Plus DNA 分子量标准；A：20℃处理的中甸角蒿叶片总 RNA；B：30℃处理的中甸角蒿叶片总 RNA

Fig. 1　Detection of total RNA isolated from leaves of *Incarvillea zhongdiannensis*

M：1 kb Plus DNA Ladder；A：Total RNA extracted from leaves at 20℃；B：Total RNA extracted from leaves at 30℃

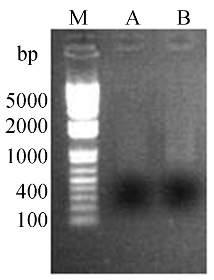


图 2　mRNA 的电泳检测

M：1 kb Plus DNA 分子量标准；A：20℃处理的中甸角蒿叶片 mRNA；B：30℃处理的中甸角蒿叶片 mRNA

Fig. 2　Detection of mRNA isolated from *Incarvillea zhongdiannensis* leaves

M：1 kb Plus DNA Ladder；A：mRNA extracted from leaves at 20℃；B：mRNA extracted from leaves at 30℃

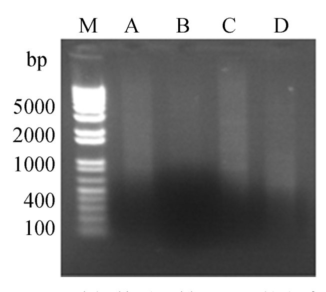


图 3　Rsa Ⅰ 酶切前后双链 cDNA 的电泳检测

M：1 kb Plus DNA 分子量标准；A 和 C 分别为 20℃和 30℃处理的 Rsa Ⅰ 酶切前双链 cDNA；B 和 D 分别为 20℃和 30℃处理的 Rsa Ⅰ 酶切后双链 cDNA 产物

Fig. 3　Electrophoresis analysis of ds cDNA before and after Rsa Ⅰ digestion

M：1 kb Plus DNA Ladder；A and C：Ds cDNA before Rsa Ⅰ digestion at 20℃ and 30℃；B and D：Ds cDNA after Rsa Ⅰ digestion at 20℃ and 30℃

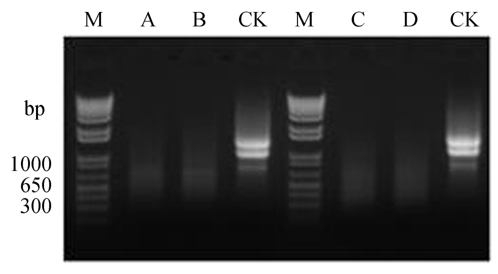


图 4　两轮 PCR 扩增结果

M：1 kb Plus DNA 分子量标准；A 和 B 分别为反向和正向消减 cDNA 第一轮 PCR 产物；C 和 D 分别为反向和正向消减 cDNA 第二轮 PCR 产物；CK 为根据试剂盒操作的阳性对照

Fig. 4　Results of first and second PCR amplification for hybridization products

M：1 kb Plus DNA Ladder；A and B：the first PCR amplification produces of reward and forward subtracted experimental cDNA；C and D：the second PCR amplification produces of reward and forward subtracted experimental cDNA；CK：positive control PCR amplification produces

2.4　差异表达 cDNA 的 PCR 产物检测

差减后的二次 PCR 产物经纯化与载体连接，转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，经蓝白斑筛选，正、反向文库分别共获得 2 320 和 3 000 个阳性克隆，文库重组率均为 93%。从构建的正、反向抑制差减 cDNA 文库中随机挑选阳性克隆，以 M13 通用引物进行 PCR 检测，结果 93% 的克隆均能扩增出有效产物，其大小为 300 ~ 1 000 bp，多数在 650 bp 左右，除去引物与所加接头的长度，实际插入差异表达 cDNA 片段大小在 500 bp 左右（图 5，6）。

2.5　差异表达 EST 测序分析

2.5.1　*正向 SSH 文库 EST 序列的功能分析*　从正向 SSH-cDNA 文库中随机挑取 30 个阳性克隆进行测序，获得 30 条非冗余 EST，最短的为 154 bp，最长的为 970 bp，片段平均长度为 566 bp。利用 BLASTx 同 GenBank 的非冗余蛋白质数据库进行同源性比对，按照注释的功能及序列来源进行分类，部分同源比较结果见表 1。分析结果表明，22 条 EST 与已知功能蛋白的同源性较高，占全部 EST 的 73.34%；4 条 EST 与未知功能蛋白同源性较高，占全部 EST 的 13.33%；另有 4 条（13.33%）未获得同源性匹配，推测为新基因。在功能已知的序列中，参与代谢相关的基因有 6 条，占 20%；参与光合作用和抗逆性相关的基因各有 5 条，均占 16.67%；参与信号转导与转录相关的基因有 2 条，占 6.67%；参与能量、蛋白质转运、蛋白质命运、及细胞结构与生长相关的基因各 1 条，均占 3.33%（图 7）。

2.5.2　*反向 SSH 文库 EST 序列的功能分析*　从反向 SSH-cDNA 文库中随机挑取 30 个阳性克隆进行测序，获得 30 条非冗余 EST，最短的为 209 bp，最长的为 961 bp，片段平均长度为 509 bp。利用 blastx 同 GenBank 的非冗余蛋白质数据库进行同源性比对，按照注释的功能及序列来源进行分类，部分同源比较结果见表 2。分析结果表明，28 条 EST 与已知功能蛋白同源性较高，占全部 EST 的 93.33%；另外 2 条 EST 与未知功能蛋白同源性较高，占全部 EST 的 6.67%。在功能已知的序列中，参与光合作用相关的基因有 9 条，占 30%；参与代谢相关的基因有 8 条，占 26.67%；参与信号转导和蛋白质合成相关的基因各有 3 条，均占 10.00%；参与抗逆性相关的基因有 2 条，占 6.67%；参与能量、蛋白质转运、及蛋白质命运相关的基因各 1 条，均占 3.33%（图 7）。

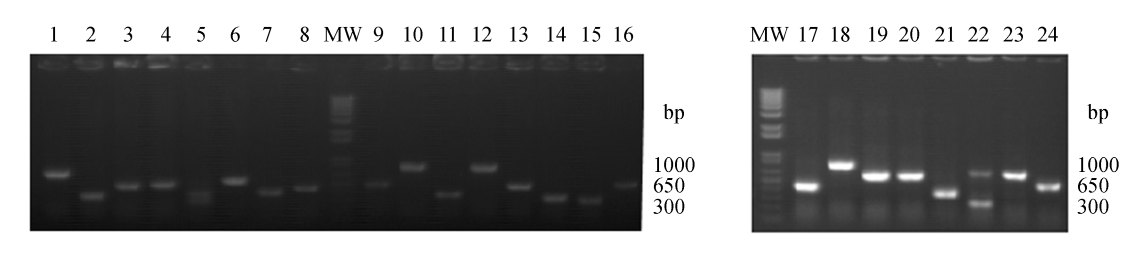


图 5　正向差减 cDNA 文库插入片段的检测　　MW：1 kb Plus DNA 分子量标准；1 ~ 24：随机挑取的克隆

Fig. 5　Identification of inserted fragments of the forward subtracted cDNA library

MW：1 kb Plus DNA Ladder；1-24：Randomly picked clones

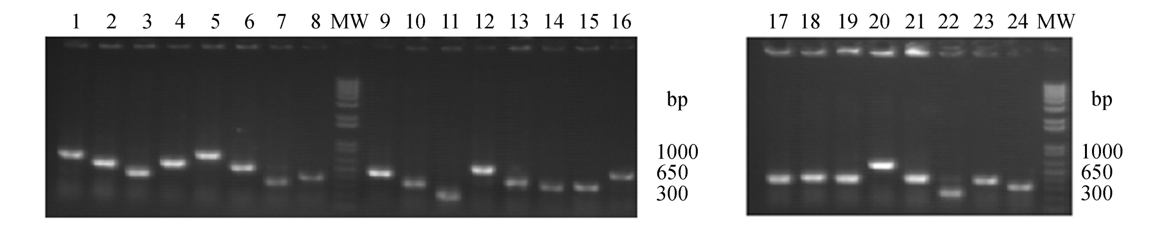


图 6　反向差减 cDNA 文库插入片段的检测　　MW：1 kb Plus DNA 分子量标准；1 ~ 24：随机挑取的克隆

Fig. 6　Identification of inserted fragments of the reward subtracted cDNA library

MW：1 kb Plus DNA Ladder；1-24：Randomly picked clones

表 1　正向 SSH-cDNA 文库部分 EST 与 GenBank 功能已知基因同源性比较

Table 1　Similarlity anaylsis of a part of forward SSH-cDNA library EST with the function identidied genes in GenBank

克隆编号 Sample No.	长度 Length /bp	同源基因片段编码的蛋白 Gene homology	种属 Organism	GenBank 序列号 Accession No.	一致性 Identity /%	E 值 E-value
光合作用 Photosynthesis						
F19	370	Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	*Oryza sativa*	ABG22613.1	97	1e-59
F140	485	Chloroplast photosystem II 5 kDa precursor protein	*Picrorhiza kurrooa*	ACI15739.1	75	2e-13
F35	344	Chlorophyll a-b binding protein	*Oryza sativa*	ABR26169.1	96	2e-75
F332	706	Chlorophyll A-B binding protein	*Oryza sativa*	ABG22426.1	93	8e-116
F122	865	Chlorophyll a/b-binding protein	*Vitis vinifera*	AAP69815.1	96	6e-51
代谢 Metabolism						
F3	318	NADH-dependent hydroxypyruvate reductase	*Pachysandra terminalis*	ABD97861.1	86	5e-48
F300	473	Phospholipase A-2-activating protein	*Ricinus communis*	XP_002519096.1	82	1e-85
F609	552	2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase	*Ricinus communis*	XP_002511268.1	83	3e-78
F46	752	5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate amidotransferase	*Nicotiana tabacum*	AAR06289.1	90	3e-73
F5	154	Lipoxygenase 3	*Actinidia deliciosa*	ABF60000.1	82	5e-22
F34	601	MPBQ/MSBQ methyltransferase	*Populus trichocarpa*	XP_002300813.1	82	3e-95
信号转导与转录 Signal transduction and transcription						
F241	376	Serine-threonine kinase	*Persea americana*	ABY58262.1	87	9e-67
F85	157	Retrotransposon protein	*Oryza sativa*	ABR26094.1	97	6e-12
蛋白质命运 Protein fate						
F615	440	Ubiquitin-conjugating enzyme UBC2	*Mesembryanthemum crystallinum*	AAD51109.1	98	8e-90
蛋白质转运 Transporter						
F199	459	Adenylate translocator	*Arabidopsis thaliana*	BAD94561.1	82	1e-21
防御/胁迫 Defense/stress						
F563	825	Catalase	*Vitis vinifera*	XP_002263134.1	83	6e-142
F312	921	NADPH:cytochrome P450 reductase	*Salvia miltiorrhiza*	CBX24555.1	81	3e-141
F619	970	Stress-associated protein 3	*Solanum lycopersicum*	ACM68440.1	70	3e-75
F538	639	Chloroplast HSP70	*Cucumis sativus*	ABM92419.1	97	4e-97
F341	228	Heat shock protein 90	*Picea mariana*	AAC32131.1	91	6e-43
细胞结构和细胞生长 Cell structure and cell growth						
F349	727	Auxilin-like protein	*Cucumis melo* subsp. Melo	ADN34187.1	72	2e-62
能量 Energy						
F614	444	Plasma membrane H+ATPase	*Prunus persica*	CAB69823.1	97	1e-47
功能未知 Function unknown						
F397	506	Hypothetical protein	*Arabidopsis lyrata* subsp. Lyrata	XP_002867313.1	66	1e-42
F302	674	Predicted protein	*Populus trichocarpa*	XP_002324174.1	40	9e-25
F216	964	Unnamed protein product	*Vitis vinifera*	CBI16561.3	54	1e-28
F275	784	Conserved hypothetical protein	*Ricinus communis*	XP_002518974.1	49	4e-54

表2 反向SSH-cDNA文库部分EST与GenBank功能已知基因同源性比较

Table 2 Similarlity anaylsis of a part of reverse SSH-cDNA library EST with the function identidied genes in GenBank

克隆编号 Sample No.	长度 Length /bp	同源基因片段编码的蛋白 Gene homology	种属 Organism	GenBank 序列号 Accession No.	一致性 Identity /%	E值 E-value
光合作用 Photosynthesis						
R24	497	PSI type III chlorophyll a/b-binding protein	*Arabidopsis thaliana*	BAF00366.1	87	6e-93
R34	230	Chloroplast chlorophyll A/B-binding protein	*Oenothera elata* subsp. Hookeri	ACA52199.1	68	4e-26
R460	915	Protoporphyrin IX:Mg Chelatase	*Antirrhinum majus*	CAA51664.1	95	2e-147
R251	421	Phosphoenolpyruvate carboxylase	*Cupressus* sp. HHG-2001	CAC81275.1	89	4e-90
R142	493	PSI P700 apoprotein A1	*Daucus carota*	CAC44035.1	94	7e-110
R619	502	Photosystem I reaction center subunit N	*Ricinus communis*	XP_002526638.1	67	6e-58
R115	585	Photosystem I reaction center subunit V (PsaG)	*Populus trichocarpa*	XP_002300801.1	59	1e-23
R485	390	Photosystem II 47 kDa protein	*Vitis vinifera*	XP_002273432.1	94	7e-92
R493	543	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase large subunit	*Euphrasia azorica*	AEK34096.1	98	2e-132
代谢 Metabolism						
R541	503	(E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase	*Artemisia annua*	ACT64770.1	95	2e-79
R266	498	12-oxophytodienoate reductase opr, putative	*Ricinus communis*	XP_002526420.1	69	1e-34
R559	351	2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase, putative	*Ricinus communis*	XP_002532876.1	77	7e-58
R389	416	4-coumaryl-CoA ligase	*Plantago major*	CAJ43713.1	90	6e-35
R338	563	Alcohol dehydrogenase, putative	*Ricinus communis*	XP_002525379.1	64	2e-30
R1	250	Glucose acyltransferase	*Solanum pennellii*	AAF64227.1	67	2e-33
R15	961	Glycosyltransferase, putative	*Ricinus communis*	XP_002531354.1	87	5e-160
R14	322	Phytoene desaturase	*Sandersonia aurantiaca*	AAL80005.1	90	2e-64
信号转导与转录 Signal transduction and transcription						
R399	893	Pentatricopeptide repeat-containing protein, putative	*Ricinus communis*	XP_002527905.1	59	5e-55
R124	592	Elongation factor 1-alpha	*Cucurbita moschata*	BAK09677.1	98	2e-69
R131	555	Zinc finger protein, putative	*Ricinus communis*	XP_002525195.1	84	4e-46
蛋白质合成 Biosynthesis						
R274	505	30S ribosomal protein S13	*Arabidopsis thaliana*	NP_568299.1	81	7e-52
R177	680	40S ribosomal protein S12	*Zea mays*	ACG24471.1	81	1e-72
R327	209	Putative cellulose synthase	*Fagus sylvatica*	AAZ79659.1	94	2e-41
蛋白质命运 Protein fate						
R629	299	Cysteine protease Cp1	*Actinidia deliciosa*	ABQ10199.1	80	2e-42
蛋白质转运 Transporter						
R254	752	Phosphatidylinositol transporter, putative	*Ricinus communis*	XP_002512943.1	72	6e-99
防御/胁迫 Defense/stress						
R299	436	Universal stress protein	*Arachis hypogaea*	ACF74293.1	93	2e-05
R107	485	Glutathion peroxidase	*Plantago major*	CAJ43709.1	92	3e-70
能量 Energy						
R190	387	Cytosolic NADP-malic enzyme	*Nicotiana tabacum*	ABI98681.2	93	2e-79
功能未知 Function unknown						
R13	567	Hypothetical protein	*Vitis vinifera*	XP_002276522.1	62	9e-50
R256	462	Hypothetical protein	*Vitis vinifera*	XP_002285487.1	81	3e-75

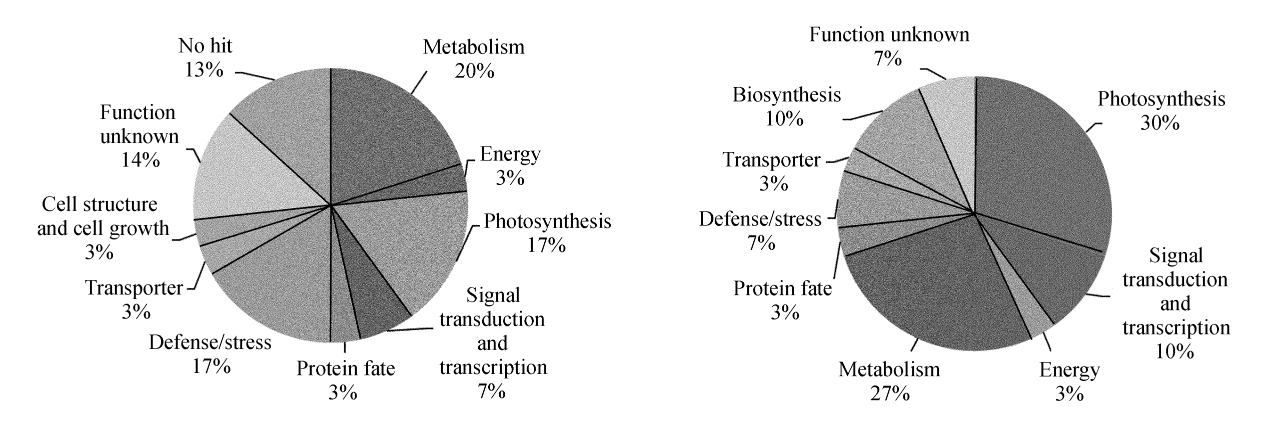


图 7　热胁迫下中甸角蒿叶片抑制性消减文库的部分 EST 按功能分类

Fig. 7　Distribution of differentially expressed gene transcripts in *Incarvillea zhongdiannensis* leaves subtraction libraries under heat stress. Fifty known ESTs were grouped into nine funtional categories according to their putative funtions. The proportions of the ESTs representing each category are shown

3　讨论

高等植物暴露于过热环境中会表现一系列特征性的细胞反应和代谢反应，如减少正常蛋白质的合成，增加热激蛋白（Heat shock proteins，HSPs）的转录与表达等。Guy（1999）研究表明在细胞和代谢水平上的变化是植物适应高温环境所必须的。当植物处于比其最适生长条件至少高 5℃的温度环境下即可产生这种胁迫变化（Zhang 等，2004，2005）。为了探讨高温对中甸角蒿基因表达模式的影响，本研究利用 SSH 技术，以适温（20℃）处理响应为对照，构建了中甸角蒿对高温（30℃）处理响应的正反向抑制性差减杂交文库。获得的已知功能的 EST 涉及到信号转导与转录、植物抗逆性反应、光合作用、代谢与能量、蛋白质命运、蛋白质合成与转运等相关基因，显示在高温下中甸角蒿在细胞和代谢水平上表现了一系列的胁迫响应特征。

在植物中，高温等非生物胁迫通常导致结构和功能蛋白质变性和功能紊乱，因此，维持蛋白质完整的功能结构和防止外援蛋白的聚合是植物细胞在胁迫条件下生存下来的关键，HSPs 就在保护植物、防御胁迫和恢复细胞自动动态平衡方面起着关键的作用（Wang 等，2004）。本研究在正向 SSH 文库中获得了 1 个 HSP70 和 1 个 HSP90 蛋白 EST。HSP70 具有维持结构和功能蛋白质稳定，防止结构和功能蛋白质变性，帮助解聚蛋白质再折叠，协助结构和功能蛋白质转运，参与信号转导和转录激活等功能（Hartl，1996；Frydman，2001）。HSP70 蛋白虽是维持正常细胞功能所必须的，但只有部分 HSP70 家族成员为组成型表达，它们主要协助新合成多肽折叠与转运。另外一部分 HSP70 家族成员是在生物体受到环境胁迫时特异表达，它们主要参与解聚蛋白质的再折叠，或促进解聚蛋白质的水解过程（Hartl，1996；Miernyk，1997；Karlin 和 Brocchieri，1998；Frydman，2001）。HSP90 主要执行完成蛋白质的折叠（Buchner，1999；Frydman，2001），在信号传导途径、细胞周期调控、蛋白质降解、蛋白质转运等方面也起到重要的作用（Young 等，2001；Richter 和 Buchner，2001；Pratt 等，2001）。推测本研究获得的这些热激蛋白基因可能被高温胁迫诱导表达，HSP70 有助于维持结构蛋白质和功能蛋白质的稳定，防止结构和功能蛋白质的变性与解聚，一旦结构和功能蛋白质发生了变性，HSP90 将帮助变性蛋白质重新折叠。

除了 HSPs，从高温处理的中甸角蒿 EST 数据库中还获得了过氧化氢酶（catalase，CAT）、细胞色素 P450（NADPH：cytochrome P450 reductase）和胁迫相关蛋白 3（stress-associated protein 3）等其他胁迫相关的基因。CATs 是一类广泛存在于生物体内的保护酶，在植物防御、胁迫应答、延缓衰老及控制细胞的氧化还原平衡等方面起重要作用（Scandalios，2005；Mandhania 等，2006）。研究表明提高植物体内抗氧化酶活性和增强氧化代谢的水平是提高植物抗逆性的有效途径（Mittler 和 Zilinskas，1991，1994）。因此，推

测在热胁迫下 *CAT* 基因在中甸角蒿叶片中上调表达，可能与叶片光呼吸产生的 H_2O_2 清除有关。P450 是一类具有多种催化功能含血红素的氧化酶系，在植物体内具有重要的生物合成功能，可以催化许多初级和次级代谢反应，并在植物的防御反应、抗逆性方面起重要作用（赵剑等，1999；Harvey 等，2002）。根据以上研究结果，推测中甸角蒿在高温胁迫环境中可能启动了一些通用的分子机制，如信号转导和转录调控，来防御和应答胁迫环境。

Crafts-Brandner 和 Salvucci（2000）研究认为高温对高等植物的伤害首先作用在光合器官，而且高等植物叶片的热耐受性限度是由发生在类囊体膜系统上的初级光化反应的热敏感性决定的（Vani 等，2001）。高温对植物光合速率的影响既存在不可逆性的效应，还包括大量的可逆性效应（Weis 和 Berry，1988）。极端高温胁迫能够导致植物光合系统Ⅱ（PSⅡ）和二磷酸核酮糖羧化酶活性不可逆性的显著的伤害（Crafts-Brandner 和 Salvucci，2000；Bernacchi 等，2002），非极端高温胁迫可能是通过降低或阻遏光合作用对植物造成伤害的（Zhang 等，2005）。本研究从正向 SSH 文库中获得了一些与叶绿素和光合作用相关的基因，如核酮糖 1，5-二磷酸羧化酶激酶基因、光系统Ⅱ相关蛋白基因和叶绿素 a/b 结合蛋白基因等。虽然还不清楚这些基因在热胁迫环境下的具体功能，但是可以推测这些基因在中甸角蒿对高温胁迫响应方面起到重要的作用。研究还发现一些参与代谢与能量等相关蛋白基因也相应出现在文库中，推测 30℃ 的温度对中甸角蒿叶片造成了高温但非致死性胁迫，中甸角蒿在高温胁迫下光合作用受到了一定的阻遏，植物为了生存努力通过糖酵解、蛋白质和脂肪降解等途径利用更多的代谢产物。

本实验成功构建了中甸角蒿高温胁迫相关基因抑制差减杂交文库，较好的体现了 SSH 技术是研究植物在非生物胁迫下基因差异表达模式的成功方法。中甸角蒿对高温胁迫响应存在着一个多基因控制的、复杂的抗逆信号应答和代谢调控网络。通过对文库中部分 EST 进行序列测定和功能分析，获得了多个可能与温度胁迫相关的基因。另外，本研究构建的 SSH 文库中还存在一些功能未知和未匹配的基因，推测为新功能基因，它们可能在增强植物热耐受性方面具有重要的作用。为了更全面、准确地了解中甸角蒿在高温胁迫环境中生存的分子机制，对 SSH-cDNA 文库的大规模测序及部分基因的全长克隆和功能验证工作正在进行中。

〔参 考 文 献〕

王文采，潘开玉，张志耘等，1990. 中国植物志 第 69 卷［M］. 北京：科技出版社，44—45

Bernacchi CJ, Portis AR, Nakano H *et al.*, 2002. Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of Rubisco enzyme kinetics and for limitations to photosynthesis in vivo［J］. *Plant Physiology*, **130**: 1992—1998

Buchner J, 1999. Hsp90 & Co. -a holding for folding［J］. *Trends in Biochemical Sciences*, **24**: 136—141

Cai YF（蔡艳飞）, Zhang SB（张石宝）, Hu H（胡虹）*et al.*, 2008. The response of *Incarvillea delavayi*（Bignoniaceae）grown in different altitudes subject to water availability［J］. *Acta Botanica Yunnanica*（云南植物研究）, **30**: 577—585

Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME, 2000. Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO_2［J］. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97**: 13430—13435

Diatachenko L, Lau YFC, Campbell AP *et al.*, 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries［J］. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **93**: 6025—6030

Du YX（杜有新）, Yang T（杨涛）, Li CC（李成才）*et al.*, 2003. Investigation of alpine wild ornamental plants germplasm resources in Yunnan province［J］. *Journal of Nanjing Forestry University*（Natural Sciences Edition）（南京林业大学学报（自然科学版））, **27**: 80—84

Feng GM（冯国楣）, 1981. The richness of the ornamental flora in Yunnan［J］. *Acta Horticulturae Sinica*（园艺学报）, **8**: 59—64

Frydman J, 2001. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones［J］. *Annual Review of Biochemistry*, **70**: 603—647

Guy C, 1999. The influence of temperature extremes on gene expression, genomic structure, and the evolution of induced tolerance in plants［A］. In: Lerner HR, ed. *Plant Responses to Environmental Stresses*［M］. New York, NY: Marcel Dekker, 497—548

Hartl FU, 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding［J］. *Nature*, **381**: 571—580

Harvey PJ, Campanella BF, Castro PML *et al*., 2002. Phytoremediation of polyaromatic hydro-carbons, anilines and phenols [J]. *Enviromental Science and Pollution Research international*, **9**: 29—47

Huang JW (黄锦文), Wu WX (吴文祥), Chen DM (陈冬梅) *et al*., 2009. Analysis of different expression of genes in *Zoysia Matrella* exposed to high temperature treatmen [J]. *Acta Agrestia Sinica* (草地学报), **17**: 435—439

Karlin S, Brocchieri L, 1998. Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution [J]. *Journal of Molecular Evolution*, **47**: 565—577

Lei M (雷鸣), Li SY (李树云), Zhang SB (张石宝) *et al*., 2009. Effects of nitrogen on photosynthesis and growth in *Incarvillea delavayi* (Bignoniaceae) [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **31**: 82—88

Mandhania S, Madan S, Sawhney V, 2006. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings [J]. *Biologia Plantarum*, **50**: 227—231

Miernyk JA, 1997. The 70kDa stress-related proteins as molecular chaperones [J]. *Trends in Plant Science*, **2**: 180—187

Mittler R, Zilinskas BA, 1991. Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase [J]. *Plant Physiology*, **97**: 962—968

Mittler R, Zilinskas BA, 1994. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought [J]. *The Plant Journal*, **5**: 397—405

Pratt WB, Krishna P, Olsen LJ, 2001. Hsp90-binding immunophilins in plants: the protein movers [J]. *Trends in Plant Science*, **6**: 54—58

Richter K, Buchner J, 2001. Hsp90: chaperoning signal transduction [J]. *Journal of Cellular Physiology*, **188**: 281—290

Scandalios JG, 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses [J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **38**: 995—1014

Vani B, Saradhi PP, Mohanty P, 2001. Characterization of high temperature induced stress impairments in thylakoids of rice seedlings [J]. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, **38**: 220—229

Wang WX, Vinocur B, Shoseyov O *et al*., 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response [J]. *Trends in Plant Science*, **9**: 244—252

Weis E, Berry JA, 1988. Plants and high temperature stress [J]. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, **42**: 329—346

Xi X (席雪), Li SY (李树云), Yan N (严宁) *et al*., 2010. Photosynthetic response of *Incarvillea zhongdiannensis* (Bignoniaceae) subject to growth irradiance [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **32**: 519—527

Young JC, Moarefi I, Hartl FU, 2001. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool [J]. *Journal of Cell Biology*, **154**: 267—274

Zhang SB (张石宝), Hu H (胡虹), Wang H (王华) *et al*., 2005. The germplasm resources and exploitation of alpine ornamental plants in Yannan [J]. *Chinese Wild Plant Resources* (中国野生植物资源), **24**: 19—22

Zhang Y, Mian MAR, Chekhovskiy K *et al*., 2005. Differential gene expression in *Festuca* under heat stress conditions [J]. *Journal of Expetimental Botany*, **56**: 897—907

Zhang Y, Zwonitzer J, Chekhovskiy K *et al*., 2004. A functional genomics approach for identification of heat tolerance genes in tall fescue [J]. *Molecular Breeding of Forage and Turf*, **11**: 87—96

Zhao J (赵剑), Yang WJ (杨文杰), Zhu WH (朱蔚华), 1999. Cytochrome P450 and plant secondary metabolism [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences* (生命科学), **11**: 127—131